

学校编码: 10384
学 号: 200225021

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

基于荧光猝灭的 BOD 微生物传感器
的研究与应用

BOD Determination and Applications Based on
Oxygen Fluorescent Quenching

林 玲

指导教师姓名: 陈 曦 教 授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2005 年 5 月

论文答辩时间: 2005 年 6 月

学位授予日期: 2005 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005 年 6 月

目 录

摘要

ABSTRACT

第一章 前言	1
1 BOD 微生物传感器的发展概况	2
2 BOD 传统测定方法	6
3 BOD 微生物传感器	8
3.1 BOD 微生物电化学传感器	8
3.2 光纤光化学 BOD 微生物传感器	12
4 BOD 生物传感器性能的影响因素	16
4.1 微生物的固定化	16
4.1.1 溶胶-凝胶固定法	17
4.1.1.1 溶胶-凝胶的基本原理	17
4.1.1.2 sol-gel 固定方法的基本性质	21
4.1.1.3 sol-gel 固定方法的基本特点	21
4.1.1.4 溶胶-凝胶技术在化学、生物传感器试剂包埋中应用现状	23
4.1.2 PVA 包埋法	26
4.1.2.1 PVA 包埋固定化微生物的原理	26
4.1.2.2 PVA 传质性能	28
4.1.2.3 PVA 固定微生物的应用	29
4.1.3 有机改性溶胶凝胶-PVA 包埋法	30
4.2 BOD 传感敏感膜中的微生物	32
5 BOD 微生物传感器与 BOD ₅ 的一致性比较	33
6 问题与展望	35
7 本工作设想	36
参考文献	38
第二章 包埋不同海水菌种对光化学 BOD 传感膜响应性能影响的研究	43
1 引言	44
2 实验部分	44
2.1 试剂	44
2.2 仪器	44
2.3 菌种及培养	46
2.4 微生物膜的制备	48
2.4.1 氧传感膜的制备	48
2.4.2 微生物膜的制备	48
2.5 测定步骤	49

3 结果与讨论.....	51
3.1 耗氧菌种固定方式的选择与优化.....	51
3.1.1 前驱体的选择.....	51
3.1.2 PVA 的影响.....	52
3.1.3 耗氧菌包埋量及膜厚度的优化.....	55
3.2 传感膜保存与活化方式的选择.....	59
3.3 清洗条件的优化.....	61
3.4 单菌膜性能的考察.....	64
3.4.1 响应时间.....	64
3.4.2 响应线性.....	65
3.4.3 响应重现性.....	67
3.4.4 温度的影响.....	68
3.4.5 pH 的影响.....	71
3.4.6 盐度的影响.....	73
3.5 金属离子的影响.....	74
3.6 标准样品的测定.....	75
3.7 传感膜的稳定性.....	76
4 结论.....	76
参考文献.....	78
第三章 包埋混合菌种对光化学 BOD 传感膜响应性能影响的研究.....	79
1 引言.....	79
2 实验部分.....	80
2.1 试剂.....	80
2.2 仪器.....	80
2.3 菌种及培养.....	80
2.4 微生物膜的制备.....	81
2.4.1 氧传感膜的制备.....	81
2.4.2 微生物膜的制备.....	81
3 结果与讨论.....	82
3.1 传感膜 BOD 响应特点.....	82
3.2 重现性.....	83
3.3 响应线性.....	84
3.4 温度的影响.....	86
3.5 pH 的影响.....	88
3.6 无机盐的影响.....	89
3.7 金属离子的影响.....	90
3.8 准确度与精密度.....	91
3.9 BOD 微生物传感器与 BOD5 的一致性比较.....	92
3.9.1 相关系数的确定.....	92

3.9.2 实际海水样品的 BOD 检测.....	93
3.10 微生物膜长期稳定性.....	94
3.11 不同配比混合菌种性能的初步考察.....	95
4 结论.....	97
参考文献.....	98

第四章 BOD 光导自动检测仪的初步研制.....	99
1 引言.....	99
2 实验部分.....	100
2.1 试剂、菌种及培养、微生物膜的制备.....	100
2.2 仪器.....	100
2.3 工作流程.....	101
3 结果与讨论.....	102
3.1 工作流程的优化.....	102
3.2 响应曲线.....	103
3.3 响应线性.....	104
3.4 响应重现性.....	105
4 展望.....	106
参考文献.....	107

在学期间发表论文

致谢

摘 要

生化需氧量 (Biochemical Oxygen Demand) 简称 BOD, 是监测水体被有机物污染状况的最常用指标, 以 mg/L 表示。BOD 微生物传感器是近二十年来发展起来的一种新型的水质分析手段, 随着光纤技术的兴起和发展, 发展光纤光化学氧传感器越来越得到人们的重视。同传统的安培检测装置相比, 光纤光化学氧传感器基于荧光或磷光猝灭原理构建, 具有响应快、检测过程不耗氧和易微型化等优点, 适合于环境监测和过程控制。目前, BOD 传感器的研究重点主要集中在城市污水和天然淡水水体的测定, 专门适用于海洋监测的仪器还未见报道, 本文以光纤光化学传感器为手段, 对微生物膜制作这一 BOD 微生物传感器的核心技术进行研究, 研制响应时间短、性能稳定、使用寿命长的微生物传感膜, 以满足海水 BOD 微生物传感器的使用。

本文共分为四章:

第一章, 文献综述, 主要介绍 BOD 检测的发展概况、基本原理及其相关技术的应用研究。

第二章, 利用海水菌种作为敏感材料, 有机改性溶胶凝胶-聚乙烯醇 (ormosils-PVA) 包埋法, 以氧传感膜作为二次传感进行 BOD 微生物传感膜的铺置。综合研究表明, ormosils-PVA 能够通过相互间的缩和作用形成网络结构从而将微生物固定在膜内并保持一定的生物活性。同时实验对一系列的实验步骤及条件进行了优化, 结果表明以海水菌种为敏感材料, 所制备的传感膜均具有响应线性好, 响应时间短, 同时具有良好的准确度及较长的使用寿命等优点, 且其适宜使用的 pH 值与海水的相同, 为研制海水 BOD 自动检测仪提供了可能。

第三章, 由于单一菌种所制备的 BOD 传感器在一定程度上对广泛底物

的降解能力较低，所能检测的有机物种类和适用的水体类型有限。因此实验考察了采用由多种微生物混合构成的微生物膜进行 BOD 微生物传感器的研制。研究表明混合菌膜与单菌膜相比较，具有响应时间短、检测限低、使用寿命长、适用于海水样品检测等优点；通过与国家标准方法 BOD₅ 法的比较，利用混菌膜进行海水 BOD 值的测定结果准确性较高。因此所研制的混菌膜适用于海水 BOD 自动检测仪的使用。

第四章，利用光化学氧传感探头代替溶氧电极探头进行溶液中溶解氧的检测的原理研制了 BOD 光导自动检测仪，并对其程序进行了一定的优化。研究表明将响应性能较好的混菌膜放入到 BOD 光导自动检测仪上进行检测同样可以得到较好的响应曲线，优良的响应线性且重现性好等结果。为今后 BOD 微生物传感器应用于海洋 BOD 的在线监测提供了一定的基础。

关键词：生化需氧量，微生物传感器，荧光猝灭，有机改性溶胶凝胶-聚乙烯醇。

Abstract

Biochemical oxygen demand (BOD) is one of the most widely used and important parameter for the estimation of water quality. Recently, with the development of the fiber optical chemical sensor, BOD sensor has become an active area of research. There are several kinds of microbial BOD sensor have been developed. In most case, BOD sensors consisted of a synthetic membrane with microorganisms as the biological recognition element, and a dissolved oxygen electrode (Clark electrode) as a transducer for oxygen measurement. In the past decade, fiber optical chemical sensors for the determination of oxygen are more attractive than conventional amperometric devices in that they can perform rapidly, do not consume oxygen and are not easily poisoned. Nowadays, there are very few BOD sensors are used to detect the BOD of seawater. In this dissertation, the study was focused on the improvement of the sensing film to develop an available biosensor for rapid and stable in-situ determination of BOD in seawater.

This dissertation includes four chapters:

In chapter I, the development, measurement mechanics and the research progress of the BOD sensor have been introduced.

In chapter II, after immobilizing microorganisms on sol-gel-PVA, optochemical BOD microbial sensing films are achieved, and the immobilized method for microorganism is investigated. Since PVA and silica are well intermixed and the interaction such as hydrogen bonding acted between them, Organically modified sol-gel (ormosils)-PVA material contributes excellent biocompatibilities that can immobilize biomolecule to fabricate biosensors. Four

kinds of sieved bacteria from seawater are used to develop the single-immobilized BOD sensing film, all of which have short response time and good response linearity and reproducibility in the BOD measurement. The effect of temperature, pH and sodium chloride in the measurement are also investigated.

In chapter III, co-immobilized BOD sensing film is achieved because each microbial species has its metabolic deficiencies, BOD film immobilized an individual microorganism is only able to respond to limited kinds of organic solutes. In the estimation of low BOD content of seawater, this kind of sensing film with co-immobilized bacteria is better in respect of sensitivity, stability and reproducibility and can be anticipated for further development.

In chapter IV, we have designed and developed an on-line roboticized device for BOD determination of seawater. The device has been loaded on a monitoring ship for marine pollution and the response behavior of the co-immobilized sensing film is also well described.

Keywords: BOD, Biosensor, fluorescence quenching, sol-gel-PVA

第一章 前言

21世纪的今天，几乎没有任何一种科学技术的发展和应用能够离开传感器和信号探测技术的支持。在当前信息量激增和新的信息类型不断涌现的情况下，用于信号探测的传感器正面临许多新的问题和新的需求，生物传感器、光纤传感器、场效应以及压电传感器等新型传感器便应运而生。近些年来，生物传感器尤其是微生物传感器在水环境监测中应用也越来越广泛。

水是生命之源，是地球上不可替代的自然资源，而现今社会，水污染日益严重，海洋生态的破坏和环境的污染，尤其是近海海域的资源破坏已经严重阻碍了经济的发展和人类的生存，因此在各种海洋环境物质的分析与监测中，分析手段的发展与进步起着至关重要的作用。在水质分析中对水中各种污染物质的测定是十分重要的，它为水质分析和评价提供依据。大多数污染物的含量测定可由容量分析和仪器分析来完成，但通常需要很长的测定时间和复杂的仪器设备。生化需氧量（Biochemical Oxygen Demand）简称 BOD，是表示水中有机化合物等需氧物质含量的一个综合指标。当水中所含有机物与空气接触时，由于需氧微生物的作用而分解，使之无机化或气体化时所需消耗的氧量即为生化需氧量，它是监测水体被有机物污染状况的最常用指标，以 mg/L 表示。目前我国在海洋领域中对许多海洋环境污染指标的监测包括生化需氧量（BOD）的监测，大部分仍采用经典的离线检测方式，即先到特定点采样，并将样品带回实验室或送到检测单位培养，然后进行分析。整个过程手续繁杂，持续时间长，分析的准确度受到限制。对于海洋、河流等水体中的污染物特别是 BOD 监测，由于其浓度随时间变化，使得许多结果的准确性与代表性受到质疑。因此随着海洋环境监测工作的不断深入，发展具有原位、在线的特点的 BOD 微

生物传感器，已越来越成为当今海洋环保监测的迫切需要。

1 BOD 微生物传感器的发展概况

早在1962年Clark和Layons就提出了生物传感器的设想。到了1976年，Verrismmen[1]提出了利用氧电极接种污泥法测定BOD的设想，该方法的提出，为BOD微生物传感器的研制奠定了基础。1977年，日本的Karube等[2]首次报道了BOD微生物传感器，他们将丝孢酵母菌用聚丙烯酰胺或骨胶原固定多孔纤维素膜上，配以伏安式二电极体系的氧电极构成了第一个快速测定BOD的生物传感器，该传感器可在15分钟左右完成污水的BOD值的测定，测定结果与BOD₅法一致；但在实际应用过程中由于细菌酶对固定化骨胶原膜的破坏，10天后传感器便丧失了活性。1979年Hikuma等[3]改用多孔醋酸纤维素膜固定酵母菌制成的BOD传感器，使用寿命延长至17天；而后Strand等[4]研制出用活性污泥富集菌BOD传感器，用于城市污水的测定，传感器的使用寿命可达20多天。

到八十年代，我国开始了对BOD微生物传感器的研究。1986年，中国科学院武汉病毒研究所的张先恩等[5]从活性污泥中分离筛选出一株对广泛底物具有外源呼吸的假单胞菌，成功地研制出了BOD微生物传感器，填补了我国在该项上的空白。该传感器由假单胞菌固定化膜和氧电极构成，可在15分钟内完成一个样品BOD的测定，并可连续使用6周以上，超过了国际同类产品的水平。1988年，孙裕生等[6]又先后制成了4种不同微生物膜的BOD微生物传感器，其测定BOD的最大范围达到60 mg/L，该仪器可连续稳定工作20天以上。1991年，上海复旦大学的邓家祺等[7]报导了伏安式快速测定BOD的微生物传感器的研制成果，这是一种新型的传感器系统，该系统以大面积黄金电极为氧电极，外覆聚四氟乙烯膜，将地衣芽孢杆菌或异常汉逊氏酵母菌细胞用海藻酸钠固定于膜上，该仪器可测定实际污水

的BOD值。二十多年来国内外已研究了多种BOD微生物传感器（表1.1），但由于灵敏度的限制，在BOD的传感检测中所涉及的样品多为较高BOD值的工业污水，并且大都是局限于微生物或酶固定技术进行氧的安培电化学监测。

表1.1 基于电化学原理的BOD生物传感器

Table 1.1 BOD sensors based electric measuring principles

微生物	响应时间 (min)	检测范围 (mg/L)	重现性 (±%)	使用寿命 (天)	参考 文献
Acticated sludge	15	5-22	7.5	10	[8]
Arxula Adeninivorans LS3	1.2	2-550	10	40	[9]
Bacillus subtilis	0.25	2-22	5	30	[10]
Bacillus subtilis (heat killed)	25	<80	2.4-3.4	140	[11]
Bacteria isolated from soil	10-15	<22	7.5	10	[2]
Hansenula Anomala	<20	1-45	6	180	[12]
Klebsiella oxytoca AS1	2.5	<44	-	-	[13]
Multi-species culture (BODSEED, heat killed)	35-50	0-45	8.5-12.4	20	[14]
Pseudomonas fluorescens	3-20	15-260	12.7	35	[15]
Pseudomonas sp.	2-15	0.5-10	10	10	[5]
Trichosporon cutaneum	3-10	0-110	4	7-30	[16]
Yeast	-	10-50	-	30	[17]
Unidentified bacteria	15	3-22	-	30	[18]

自80年代开始, 光纤技术得到迅速的发展, 应运而生的光纤传感技术也开始为人们所关注。通过光纤端部修饰一层化学识别敏感膜, 实现光纤传感到对分子、离子主动的识别。传统的光学与纤维光学结合, 使光化学传感器的研究真正取得了突破性的发展, 并在环境监测等领域得到了广泛的应用。光纤生物传感器也被应用于溶解氧(DO)与BOD的测量中, 1994年, Preininger等人[16]首次报道了基于氧光学敏感膜检测溶解氧的光纤BOD微生物传感器。随后Li等人[19]也在普通BOD₅ 的培养过程中做过类似的研究。近几年来Chee [20]以及Koenig等人[21] 曾介绍了使用商用溶解氧光纤纤维制成的BOD 传感器来测量氧的荧光猝灭。相比较而言, 光纤生物传感器比安培电流计传感器具有长时间的操作稳定性、不需要消耗溶解氧、不需要参比单元以及不受样品流速和扰动程度的影响等优点。因此光纤传感器利用光化学氧传感探头代替溶氧电极探头进行溶液中溶解氧的检测, 与微生物膜集成后进行污水中BOD值的间接测定, 将成为新一代BOD微生物传感器研究的主要方向。

经过对BOD生物传感器多年的研究, 目前国内外已有多种有关BOD生物传感器的研究方法及产品问世。这些传感器可大致分为几种类型: 以溶氧电极为基础的微生物电极、以燃料电池电极与固定化微生物膜组成的微生物电极和以固定化微生物电极作阳极的生物燃料电池型, 而应用最多的是以溶氧电极为基础的微生物电极。日本是开展BOD微生物传感器研究最早的国家之一, 1983年, 日本自新电机公司推出了首台BOD-1100型快速测定仪[22], 使得BOD微生物传感器进入了实用阶段, 并于1990年制定出BOD生物传感器测定仪的工业标准(JIS K3602) [23]。此后, 美国、澳大利亚、德国和西班牙等国家相继研制出类似的BOD测定仪, 并出现了相关的专利报道[24]。Suzuki等[25]人报道使用微制造技术制作大量小型的、可一次性使用的氧电极, 推动了BOD传感器朝更加廉价、实用、便携的方向发展。

近些年来国内也研制了诸多不同类型的BOD测量仪。1998年杜晓燕等[26]报导了一种用皮状丝孢酵母组成的BOD微生物传感器和流通式微机化快速BOD测定仪,对样品BOD的响应时间为3-7 min,测定范围为10-60 mg/L,并通过了部级鉴定,现已有产品销售。从1996年到2000年间,天津、沈阳等城市也相继推出了BOD快速测量仪,如天津塞普环保科技发展有限公司的220A型微生物法BOD快速测定仪,属目前市面上较成熟的BOD微生物电化学传感器,仪器将微生物膜紧固于隔膜式氧电极上组成微生物电极,采用流通测量方式,并由流通测量池组件固定微生物膜,此测量仪具有优越的性能,响应时间小于8 min,电极寿命2年以上,微生物膜的寿命静态保存为一年,使用后亦可达30天,恒温效果良好,整机比较轻便,便于实地测定。此后推出220B型BOD快速测定仪(图1.1),广泛适用于地表水,生活污水和大部分工业废水的监测。2001年1月,国家环保局将微生物传感器测定BOD法批准为国家行业标准,促进了我国BOD生物传感器商品化的发展。但迄今为止,只有日本用BOD生物传感器法代替了传统的BOD₅法,并建立了相关的标准,究其原因,核心问题即生物膜的制备和菌种的选择与培养均未达到完善的阶段,所以真正实现用BOD生物传感器法代替传统的BOD₅法还需诸多的探索。



图 1.1 TS1-BOD220B BOD快速测定仪

Fig 1.1 TS1-BOD220B rapid instrument for BOD monitor

目前利用荧光猝灭原理的氧光纤化学传感器可进行BOD的快速测量,具有实时、快速及在线等优点,但传感器的灵敏度、稳定性和使用寿命等方面距现场使用还有一定的差距。而以生物反应器作为仪器传感器的也是一种连续快速测定BOD的方法,德国STIP公司生产的BIOX-1010型连续快速BOD在线测定仪,澳大利亚梅姆特克公司生产的BOD在线测定仪都是采用了生物反应器法[27]。

综上所述,经过几十年的探索,各种 BOD 微生物传感器相继问世且朝着小型化发展。因此,用传感器方法代替传统的标准稀释法是大势所趋,也是人类社会进步的象征。

2 BOD 传统测定方法

有机物在微生物作用下的好氧分解分为两个阶段,在第一阶段内被氧化的主要是易于分解的含碳有机物;第二阶段被氧化的是含氮有机物。对于生活污水而言,在 20 °C 条件下,第一阶段约需 16 天,第二阶段可能达到数十天至 100 天。

传统 BOD 测量方法是现场取样实验室分析,即将水样在 (20 ± 1) °C 条件下培养 5 天,分别测定样品培养前后的溶解氧值,二者之差为微生物降解有机物所消耗的溶解氧,通常称之为 5 日生化耗氧量,以 BOD_5 表示。这种方法早在 1913 年英国皇家污水处理委员会就首次提议[27],将有机物在 5 天 18.3 °C 条件下,进行生物氧化所需消耗溶解氧的量作为水质有机物污染程度的指标。1936 年,美国公共卫生协会将 (20 ± 1) °C 五日生化需氧量稀释法规定为水和废水的标准检验方法,即 BOD_5 法[28]。我国也于 1987 年颁布了国标 GB7488-87,将 BOD_5 法定为生物化学需氧量的标准分析方法。

BOD_5 的测定原理为某些好气性微生物在有氧条件下,能破坏化学性

能较稳定的碳氢化合物，经过醇、有机酸等中间产物，最后将有机物氧化为 CO_2 和 H_2O 。通常该过程分为以下 3 个阶段[29]:

- (1) 微生物的脱氢酶使基质活化，基质的氢传递给中间传递体；
- (2) 微生物的氧化酶使水中的溶解氧活化；
- (3) 活化的氧和脱氢酶活化基质时所脱下的氢结合生成水，活化的氧与基质中余下的碳结合生成二氧化碳。

使用标准稀释法测定污水 BOD 值实际上是一个生物化学过程。虽然此方法已经成为国际公认的标准测定法，广泛应用于污水处理及环保工业，但其缺点也十分明显：

- (1) 分析周期长，操作繁杂；每次检测需要 5 至 7 日才能得到结果，不能及时反映水质情况，且无法了解中间变量，返工率高，信息量小；
- (2) 测定精度差；用标准稀释法测定污水中 BOD 值，前后必须进行两次化学分析测定溶解氧，容易受外界因素干扰造成较大偏差，且对分析员具有熟练的操作技巧的要求较为严格；
- (3) 重现性差；由于污水中有机物的结构不同，其生化降解过程所需的时间也就不同，因此，用标准稀释法测定污水 BOD，其测定值的波动范围大，分析误差高达 $\pm 20\%$ ，可信度不高；
- (4) 对于某些成分复杂的工业废水，很难甚至无法按标准检测方法进行分析。

由于传统的标准稀释法存在上述诸多缺点，因而给污水处理及环境监测带来了许多不便。目前，测定 BOD 的方法除了标准稀释法外还有较高温度法[30]、短时日法[31]、瓦勃呼吸法[32]、电呼吸计法[33]以及微生物传感器法[16,17]等，其中微生物传感器法的出现为环境监测的连续化和自动化在线检测提供了可能，同时还将进一步降低了环境监测的成本，提高环境监督的力度。

3 BOD 微生物传感器

国际纯粹和应用化学联合会(IUPAC)对化学传感器的定义为:一种小型化的、能专一和可逆地对某种化合物或某种离子具有应答反应,并能产生一个与此化合物或离子浓度成比例的分析信号的传感器。生物传感器是一类特殊的化学传感器,利用生物感应元件的专一性与一个能够产生和待测物浓度成比例的信号传导器结合起来的分析装置。与其它传感器不同的是生物传感器是以生物学组件作为主要功能性元件,能够感受规定的被测量,基于它的生物敏感材料来自生物体。

BOD 微生物传感器的原理是基于微生物对有机物的耗氧代谢。与传统方法的差别在于:传统方法通过五天培养的绝对耗氧量来计算 BOD 值,而微生物传感器法测定 BOD 只涉及到初始氧化速率,可以通过对标准废水的测定找到两者的相关性。根据微生物和待测物结合后产生信号性能不同可将微生物传感器主要分为:电化学传感器和光化学传感器。

3.1 BOD 微生物电化学传感器

BOD 微生物电化学传感器属于呼吸活性测定型传感器,大多是由微生物固定化膜和氧电极所构成。其工作时将 BOD 微生物膜测量传感器置于恒温测量池中,由于缓冲液中富含氧而不含有机化合物,此时微生物仅进行基础呼吸,其呼吸强度是恒定的,当溶液中溶解氧扩散进入氧电极表面的速率达到恒定时,其电极电流输出也将达到恒定且相对最大的电流值,测定中往往将此时的相对稳定的最大电流值称之为本底电流或基线电流(图 1.2a)。当含有一定浓度缓冲液的 BOD 标样(或试样)加入测量池中时,由于水样中有机物进入测量池并向微生物膜扩散,被微生物作为营养源所利用,在同化有机物的同时,微生物呼吸活性加强,消耗溶液中的溶解氧,相应其扩散进入电极表面溶解氧速率减小,输出电流值降低,待几分钟后

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库